

TİP 1 DİYABETES MELLİTUS OLUŞTURULAN SIÇANLARIN BEYNİNDE LEPTİN MİKTARI AZALMAKTADIR

LEPTIN QUANTITY DECREASES IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS INDUCED RATS BRAIN

Erhan ŞAHİN¹, Öykü ÖZCAN¹, Ezgi BEKTUR¹, Cengiz BAYÇU², Ümide ÖZKAY DEMİR³,
Özgür Devrim CAN³, Varol ŞAHİNTÜRK¹

¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

²Okan Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

³Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı

ÖZ

AMAÇ: Leptin hormonu, iştah ve vücut metabolizmasının düzenlenmesinde önemli görevler üstlenmekte ve başlıca yağ dokusunda sentezlenmektedir. Leptinin yağ dokuda sentezlendikten sonra koroid pleksus aracılığı ile beyne taşındığı bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı Tip 1 diyabetes mellitus oluşturulan sıçanların beyinde leptin ifadesinin ve miktarının araştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmamızda toplam 14 adet yetişkin, erkek Wistar Albino sıçan 2 eşit gruba ayrıldı (n=7). Kontrol grubuna hiçbir uygulama yapılmadı. Diyabetes mellitus grubundaki hayvanlara ise tek doz (55 mg/kg) streptozotocin intraperitoneal olarak verildi ve kan glukoz seviyesi >280 mg/dL ölçüldüğünde Tip 1 diyabetes mellitus geliştiği kabul edildi. Deney sonunda alınan beyin örnekleri %10'luk formaldehit ile fikse edildikten sonra rutin doku takip işleminin ardından alınan kesitlere leptin immünohistokimyasal boyaması uygulandı. Beyin dokularında western blot yöntemi ile leptin miktarına bakıldı.

BULGULAR: Tüm gruplara ait beyin kesitlerinde sadece koroid pleksusta leptin boyanması saptandı. Buna göre, leptin boyanmasının Tip 1 diyabetes mellitus geliştirilen sıçanlarda azaldığı saptandı. Western blot ile Tip 1 diyabetes mellitus grubunda leptin miktarının belirgin olarak azaldığı saptandı.

SONUÇ: Bu çalışmayla tokluk hissini oluşturmak üzere koroid pleksus üzerinden beyne geçen leptin hormonu ile diyabet arasında yakın bir ilişki olduğu ve bu hormonun diyabetle azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmadan yola çıkarak Tip 1 diyabet ve leptin hormonu ilişkisi derinlemesine irdelenmelidir.

ANAHTAR KELİMELEER: Diyabetes mellitus, beyin, leptin, koroid pleksus.

ABSTRACT

OBJECTIVE: Leptin hormone plays an important role in regulation of appetite and body metabolism and is mainly synthesized in fat tissue. It is known that leptin is transported to the brain via choroid plexus after synthesized in the fat tissue. The aim of this study is to investigate the amount and expression of leptin in the brain of rats with type 1 diabetes mellitus.

MATERIAL AND METHODS: A total of 14 adult male Wistar Albino rats were divided into 2 equal groups (n = 7). No application was made to the control group. A single dose (55 mg/kg) of streptozotocin was administered intraperitoneally to the animals of the diabetes mellitus group and it was considered that type 1 diabetes mellitus developed when blood glucose level > 280 mg/dL. Brain samples taken at the end of the experiment were fixed with %10 formaldehyde and then subjected to routine tissue monitoring followed by leptin immunohistochemical staining. The amount of leptin was determined by western blotting in brain tissues.

RESULTS: In all groups leptin staining was detected only in the choroid plexus of rat brains. According to this knowledge, it was determined that leptin staining decreased in type 1 diabetes mellitus developed rats. The decreased leptin in the type 1 diabetes mellitus group was showed by western blot too.

CONCLUSIONS: Type 1 diabetes reduces the expression and amount of leptin in the choroid plexus.

KEYWORDS: Diabetes mellitus, brain, leptin, choroid plexus.

Geliş Tarihi / Received: 21.03.2018

Kabul Tarihi / Accepted: 15.10.2018

Yazışma Adresi / Correspondence: Dr. Erhan ŞAHİN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
sahine@ogu.edu.tr

GİRİŞ

Leptin ilk olarak 1994 yılında bulunmuş olup 167 aminoasitten oluşan, 16 kDa ağırlığında ve yağ dokusundan salınan bir hormondur. Leptinin ana üretim yeri yağ dokusu olmasına rağmen mide, meme epiteli, plasenta ve kalp dokusunda da daha az miktarda sentezlendiği gösterilmiştir. Leptin hormonu hedef dokularda etkisini leptin reseptörleri (LEPR) üzerinden gerçekleştirir. Bu reseptörler genel olarak hipotalamus ve beyincikte bulunmaktadır. LEPR aynı zamanda midede, kan damarlarında ve plasentada da tanımlanmıştır (1). Leptin, üretildikten sonra yağ dokusundan kana salınır, kan-beyin bariyerini geçebilir ve beyin merkezlerine vücudun mevcut yağ durumu hakkında bilgi verir. Ayrıca, pubertenin başlamasında, bağışıklık sistemi ve inflamasyon yanıtında, damar oluşumunda, kan ve kemik yapımı ile yara iyileşmesi gibi birçok olayda leptinin görev aldığı gösterilmiştir (2, 3). Ancak, leptinin vücuttaki asıl görevi beyin merkezleri üzerine etki ederek tokluk hissi oluşturmaya ve besin alımını azaltarak vücut ağırlığı ile enerji dengesini sağlamaktır. Leptin tokluk hissini hipotalamustaki reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirir. Hipotalamus nöronlarında yeme isteğini baskılayan (anoreksijenik) nöropeptitlerin salınımını sağlarken yeme isteğini arttıran (oroksijenik) nörotransmitterlerin ve bu transmitterleri uyaran ghrelin gibi hormonların etkinliğini baskılar (4). Obezler ve aşırı kilolularda plazma leptin düzeyinin çok yüksek olduğu, fakat obezlerin beyindeki LEPR sayısının azalması nedeniyle leptinin etkili olamadığı gösterilmiştir (5).

Diyabetes mellitus, endokrin hastalıklar arasında en sık görülenidir. DM Tip 1, Tip 2, gestasyonel DM (gebelik diyabeti) ve özgül nedenlere bağlı DM olmak üzere 4 gruba ayrılır. Son verilere göre Dünyada yaklaşık 40 milyon Tip 1 DM hastası bulunmaktadır (6). Tip 1 DM, juvenil DM ya da insüline bağımlı DM olarak da bilinmektedir. Genellikle pankreastaki beta hücrelerinin otoimmün hasarına bağlı olarak gelişen insülin eksikliği biçiminde ortaya çıkmaktadır (7). Son yıllarda yapılan araştırmalar leptinin kandaki yüksek glukozu normal düzeylere getirme ve insülin duyarlılığını artırma gibi etkilerinin olduğunu göstermiştir. Tip 1 DM hastalarında lep-

tin hormonunun miktarı tartışmalı konulardan birisidir. Araştırmacılardan bir kısmı Tip 1 DM'de leptin hormonu düzeyinin değişmediğini (8, 9) ileri sürerken bir kısmı da aşırı arttığını bildirmişlerdir (10). Bu konu henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Böylece, bu çalışmanın amacı, deneysel olarak oluşturulan Tip 1 DM'li sıçanların beyinlerinde leptin dağılımı ve miktarının araştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanları ve Etik Kurul

Araştırmamızda, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi'nden sağlanan, 8-10 haftalık, 250-300 g ağırlığında toplam 14 adet erkek Wistar Albino türü sıçan kullanıldı. Hayvanlara yapılacak uygulamalar için aynı üniversitenin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (14.12.2017, 628-2).

Deney Yöntemi

Hayvanlar, 12 saat aydınlık/12 saat karanlıkta ve 25 ± 2 °C'de, içme suyu ve standart hazır yeme serbestçe ulaşabilecekleri kafeslerinde barındırıldılar. Ortama alışma süresi olarak geçen 14 günden sonra her birinde 7 sıçan olacak şekilde rastgele 2 gruba ayrıldılar. Deney hayvanlarının refahını sağlamak için standart kafeslerden daha büyük özel kafesler kullanıldı (46x83x21 cm). Kontrol grubundaki hayvanlara hiçbir uygulama yapılmadı. DM grubundaki hayvanlara 55 mg/kg streptozotosin (Sigma, Darmstadt, Almanya) 0.1 mol/L sitrik asit tamponu (pH=4.5) içerisinde çözülerek intraperitoneal (i.p.) yolla tek doz olarak verildi. Streptozotosin uygulamasından 72 saat sonra, 12 saatlik açlığa bırakılmış sıçanların kan glukoz düzeyi kan şekeri ölçüm cihazı (Life Check compact TD, Tail Doc Technology Corporation, Taiwan) ile kuyruk veninden alınan bir damla kanda ölçüldü (11). Glukoz düzeyi >280 mg/dL olarak saptanan sıçanlarda Tip 1 DM meydana geldiği kabul edildi (12) ve 28 gün bu koşullarda yaşatıldılar. Deney sonunda tüm sıçanlara intramüsküler ketamin (45 mg/kg) ve ksilazin (50 mg/kg) karışımı enjekte edilerek uyutuldu. Beyinleri hızlı bir şekilde çıkarılarak histolojik çalışmalar için %10'luk tamponlu formaldehite ve Western blot çalışmaları için -80°C dolabına koyuldu.

Histolojik preparatların hazırlanması

Hayvanların beyinleri dikkatlice çıkarıldıktan sonra % 10'luk tamponlu formaldehit içerisinde 24 saat süreyle tespit edildi. Fiksasyon işleminden sonra sıçan beyinleri longitudinal fissür boyunca kesilerek beyin iç bölgesi kesit düzlemine gelecek şekilde iki yarıküre birbirinden ayrıldı. Daha sonra olağan histolojik işlemlerden geçirilerek parafin bloklar elde edildi. Hazırlanan parafin bloklardan poli L-lizini lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Koroid pleksus yer tespiti için beyin longitudinal kesiti incelendi. Kesit düzleminde lateral ventriküller ve hipokampusun yer tespit edilerek koroid pleksusa ulaşıldı. İncelemeler sırasında koroid pleksus tek katlı kübik veya prizmatik epitel ve altındaki bol damarlı gevşek bağ dokusuyla karakterize olduğundan incelemelerimiz ve araştırmamız bu yönde yapılmıştır.

Leptin immünohistokimyasal incelemesi

Beyin kesitleri, parafin giderme işlemi için 2 kez 15 dakika ksilolde bırakıldıktan sonra sırasıyla % 100, % 96 ve % 80'lik etil alkollerin her birinde 10'ar dakika tutuldu. Her birinde 5'er dakika olmak üzere 2 kez distile sudan geçirilen kesitlere 15 dakika % 3'lük hidrojen peroksit uygulanarak endojen peroksit aktivitesi bloke edildi ve fosfat tamponlu tuz (PBS) ile 3 kez 3'er dakika yıkandı. Kesitlere Ultra V blok solüsyonu uygulanarak 10 dakika bekletildikten sonra üzerine Leptin (sc-842, Santa Cruz, USA) primer antikor eklenip bir gece +4 °C'de bekletildi. Ardından oda ısısına alınan kesitler PBS ile yıkayıp üzerine biyotinli sekonder antikor eklenerek 10 dakika ve tekrar PBS ile yıkayıp streptavidin-peroksidaz enzim kompleksinde yine 10 dakika bekletildiler. Daha sonra PBS ile yıkayıp kromojen AEC uygulanarak gözle görülebilen immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı. Hematoksilin ile çekirdek boyaması yapıldıktan sonra lamalar kapatılarak Olympus BX 51 mikroskopu ile incelenerek uygun görüntüler alındı.

Doku homojenizasyonu

Tüm beyin dokusu boncuklarla beraber 2 ml'lik homojenizasyon tüpüne konuldu. Tüpe, içerisinde proteinaz inhibitör kokteyli bulunan 1 ml doku liziz tamponu eklendi. Tüpler boncuklu ho-

mojenizatörde (Benchmark Scientific BeadBlaster 24 Position Homogenizer, Sayreville NJ 08872 USA) 2 dakika süresince homojenize edildi.

Protein miktar tayini

Protein miktarı qubit protein tayin kiti ve Qubit 2.0 Fluorometre cihazıyla bulundu. Bu yöntemde floresans veren boyaların proteinlere bağlanması ve cihazda ölçülmesi esastır. Özellikle protein izolatlar saf su ile 1/50 oranında sulandırıldı. Kit içerisinde bulunan stok floresan boya örnek sayısına göre 1/200 oranında kit içerisinde bulunan buffer ile karıştırılarak working solution hazırlandı. 10 µL sulandırılmış protein ve 190 µL working solution karıştırıldı, karanlıkta 15 dak. bekletildi ve sonra Qubit 2.0 Fluorometre cihazında ölçüldü.

Western blot yöntemi

Her grupta eşit miktarda protein olacak şekilde proteinler 2:1 oranında örnek tamponuyla eşitlenerek buz üzerine konuldu. Daha sonra 5 dakika 95°C'de kaynatılarak tekrar vortekslenip santrifüj edilerek buz üzerine yerleştirildi. Çalışılacak olan proteinin kilo dalton ağırlığı dikkate alınarak uygun yüzdelerde jeller hazır olarak alındı. Jel, elektroforez tankına yerleştirildi. Jelin her kuyucuğuna, başta 5 µl moleküler ağırlık işaretleyicisi olmak üzere, 20 µl protein içeren örnekler yüklendi. Örnekler kuyucuklardan inene kadar ilk önce 80 V'de, sonra 130 V'de 1,5 saat oda sıcaklığında jelin sonuna kadar yürütme tamponu içerisinde yürütüldü. Elektroforez işleminden sonra jeldeki proteinler membrana aktarıldı. Ardından membran 1 saat süre ile oda ısısında, yatay karıştırıcı üzerinde, tris buffered saline - tween 20 (TBS-T) ile hazırlanan % 5'lik BSA ile blokladı. Bloklama işleminden sonra, membran bloklama tamponu ile sulandırılmış primer antikorlarla bir gece +4°C'de yatay karıştırıcı üzerinde tutuldu. Ertesi sabah membran primer antikordan alınarak, TBS-T çözeltisiyle dolu kaba aktarılarak 4 kez 5'er dakika yıkandı. Yıkama işleminden sonra membran bloklama tamponu ile sulandırılmış sekonder antikorla bir saat oda sıcaklığında, yatay çalkalayıcı üzerinde tutuldu. Sekonder antikor sonrasında tekrar TBS-T ile 4 kez 5'er dakika yıkandı. Ardından kemilüminesans madde ile 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip kemilüminesans görüntüleme yapan Li-

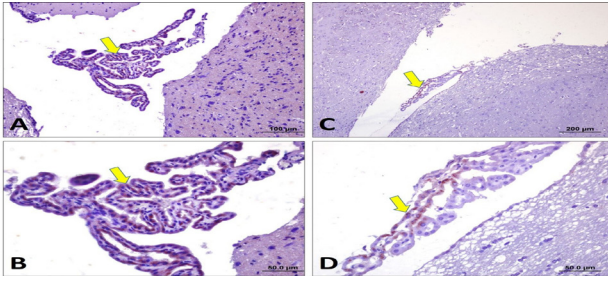
cor C-Digit marka cihazla membrandaki protein bantların görüntüleri alındı. Western blot deneyi sonucunda elde edilen bantlar image studio Lite ver. 5.2 programı kullanılarak analiz edildi.

BULGULAR

İmmünohistokimyasal bulgular

Kontrol ve DM gruplarına ait beyin kesitlerinde leptin boyanmasının gerçekleştiği ve her iki grupta da leptin ifadesinin yalnızca koroid pleksusta beyin omurilik sıvısını üreten hücrelerde olduğu belirlendi. Leptinin immünohistokimyasal boyanma yoğunluğu karşılaştırıldığında, DM grubunda leptin boyanmasının kontrol grubuna kıyasla daha zayıf olduğu görüldü (**Şekil 1**).

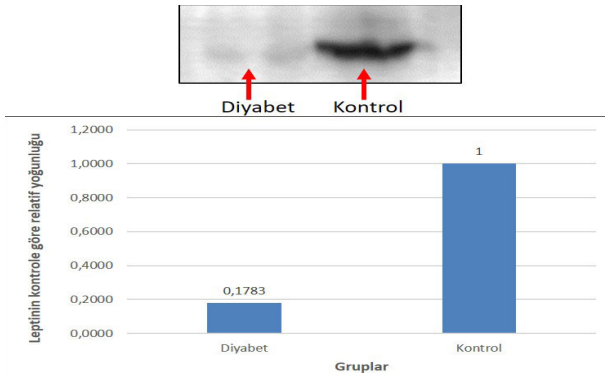
Şekil 1. Sıçanların beyin kesitlerine ait mikroskopik görüntüler. Kesitler leptin için immünohistokimyasal olarak boyanmıştır. Her iki grupta da pozitif boyanmanın sadece beyin koroid pleksus (ok) bölgesinde olduğu dikkati çekmektedir. A ve B: Kontrol grubunda yoğun pozitif boyanma, C ve D: Diyabetes mellitus grubunda zayıf boyanma görülmektedir. Çubuklar B ve D'de 50 µm (40X), A'da 100 µm (20X) ve C'de 200 µm (10X)'dir.



Western blot bulguları

Western blot sonuçları immünohistokimyasal sonuçlar ile paralellik gösterdi ve relatif leptin yoğunluğunun kontrol grubuna kıyasla DM grubunda 0,178 düzeyinde olduğu saptandı (**Şekil 2**).

Şekil 2. Western blot yöntemiyle elde edilen sonuçlara göre DM grubunda leptinin relatif yoğunluğunun kontrole göre belirgin olarak azaldığı görülmektedir.



TARTIŞMA

Bu çalışmayla tokluk hissini oluşturmak üzere koroid pleksus üzerinden beyne geçen leptin hormonu ile diyabet arasında yakın bir ilişki ol-

duğu ve bu hormonun diyabetle azaldığı gösterilmiştir. Leptin, hipotalamustaki reseptörleri aracılığıyla iştahı baskılayan, enerji tüketimini ve insülin hassasiyetini arttıran bir hormondur (6, 13). Leptinin ana hedefinin doğrudan beyin merkezleri olması bizi bu çalışmada beyin dokusuna geçen leptin miktarını araştırmaya yöneltmiştir.

Leptin salınımı başta insülin olmak üzere katekolaminler, glukokortikoidler, tiroid hormonları ve gonadal steroidler gibi birçok hormon tarafından kontrol edilmektedir. İn vitro yapılan birçok çalışmada insülinin leptin salınımını uyardığı gösterilmiştir (14-16). İnsülin leptin salgılatıcı etkisini doğrudan yapabildiği gibi artmış glukoz metabolizmasının da bunu uyarabileceği düşünülmektedir (16). Leptin salınımında insülinin etki mekanizması tam olarak belirlenememiş bir metabolik yolaktır.

Çalışmamızın immünohistokimyasal bulguları leptinin beyinde sadece koroid pleksusta pozitif reaksiyon verdiğini gösterdi. Bizim çalışmamıza ek olarak Banks ve arkadaşları yaptıkları çalışmada yağ dokuda sentezlenen ve kana salınan leptinin koroid pleksus, medyan eminens ve arkuat çekirdek bölgelerinden de beyin içerisine geçtiğini göstermişlerdir (17). Zlokovic ve arkadaşları leptinin beyin içerisine taşınımında ana yolağın koroid pleksus olduğunu bunun dışındaki bölgelerin payının çok düşük olduğunu göstermişlerdir (18). Di Spiezio ve arkadaşları yaptıkları çalışmada leptinin kan beyin bariyerini reseptör aracılı olarak koroid pleksus bölgesinden geçtiğini bildirmişlerdir (19).

Leptinin yağ dokuda sentez edilip kana salınmasını uyarın birçok mekanizma ve molekül bulunmaktadır. Bu mekanizmaların çözülmesi başta obezite ve DM olmak üzere birçok hastalığın anlaşılmasını kolaylaştırıcaktır. Wang ve arkadaşları insülinin yağ hücrelerinde hazır olarak bulunan leptin veziküllerini hareketlendirdiğini ve hücre sitoplazması dışına taşıdığını, stoklar tükendikten sonra da mRNA seviyesinde yağ hücrelerine yenilerini sentezlettiğini göstermişlerdir. Bu işlemlerin hücre içi kalsiyum ve inozitol üç fosfat/Akt yolağı üzerinden gerçekleştiğini bulmuşlardır (20). Obezlerde insülin direncinin gelişmesi kan insülin miktarının artmasına neden olur. Obez bireylerde leptin miktarı da yüksek bulunmuştur (21).

Mueller ve arkadaşları yağ hücreleri ile yaptıkları çalışmada glukoz taşınması ve metabolizmasını baskıladıklarında, insülin varlığında leptin salgılanmasının azaldığını, açlıkta leptin seviyesinin düşmesinin ve toklukta artmasının glukoz metabolizmasıyla ilişkili olduğunu ve insülinin dolaylı olarak etkili olduğunu göstermişlerdir (22). Wellhoener ve Sonnenberg de kendi ekipleriyle yaptıkları çalışmalarda insülinin dolaylı olarak etki ettiğini saptamışlardır (23, 24). Leptin salınımı üzerinde glukoz metabolizmasının mı yoksa insülinin doğrudan kendisinin mi etkili olduğu tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Bizim çalışmamızda, STZ ile pankreas beta hücrelerinde insülin üretimi baskılandığında beyne geçen leptin miktarının da azaldığı görüldü. Wellhoener, Sonnenberg ve Mueller'den farklı olarak biz leptin salınımında insülinin doğrudan etkili olduğunu düşünüyoruz. Bazı çalışmalar insülinin leptin salınımında erken aşamada etkili olduğunu, geç dönemlerde glukoz metabolizmasının etkili olabileceğini göstermişlerdir. Biz çalışmamızda uzun süreli kontrol altında olmayan insülin eksikliğinin leptin salınımını düşürdüğünü gözlemledik.

Adipositlerin sitoplazmasında var olanların salınımı ve temelde yeni leptinlerin sentezlenmesi üzerine Tsubai ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, Mueller'den farklı olarak, glukoz metabolizmasının leptin salınımında çok fazla etkili olmadığı, adipositlerin in vitro ortamda ve insülin varlığında leptin salgılayabildikleri gösterilmiştir (16).

Aşırı kilolu ve Tip 1 DM'li hastalarda kan leptin miktarını araştıran bir çalışmada DM'li grupta leptin ifadesinin anlamlı bir şekilde düştüğü saptanmıştır (25). Bu konuda yapılan çalışmaların bazısı Tip 1 DM durumunda leptin ifadesinin değişmediğini (26), bazısı ise arttığını göstermiştir (27-29).

Bizim çalışmamızda da Tip1 DM durumunda, yani baskılanmış insülin salınımı durumunda, sıçanlarda leptin ifadesinin düştüğü gösterilmiştir. Bu düşüş leptin salınımının insülin salınımıyla paralellik gösterdiğini düşündürmektedir. Bu bulgumuz Tsubai ve arkadaşlarının çalışmasına benzerlik göstermektedir. Leptin ve insülinin vücuttaki önemli görevleri göz önüne alındığında, aralarındaki etkileşim mekanizma-

sının çözülmesi; başta obezite, Tip 1 ve Tip 2 DM olmak üzere birçok hastalığın tanı ve tedavisinde yeni ufuklar açabilecektir. Bu konunun kesin olarak açıklığa kavuşturulabilmesi için özellikle moleküler etkileşim ve yolakların ortaya çıkarılmasına yönelik daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine sağladıkları maddi destek için teşekkür ederiz (Proje No: 2016-1222). rak anlamlı bir fark bulamadık.

KAYNAKLAR

1. Klok M, Jakobsdottir S, Drent M. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity reviews*. 2007;8(1):21-34.
2. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *Journal of leukocyte biology*. 2000;68(4):437-46.
3. Takeda S, Elefteriou F, Lévassieur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*. 2002;111(3):305-17.
4. Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, et al. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*. 2001;50(2):227-32.
5. Lin S, Storlien LH, Huang X-F. Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain. *Brain research*. 2000;875(1):89-95.
6. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition*. 1995;269(5223):543-5.
7. Abac A, Böber E, Büyükgebiz A. Tip 1 Diyabet. *Güncel Pediatri* 2007;5:1-10.

8. Geyikli İ, Keskin M, Kör Y, Akan M. Increased resistin serum concentrations in patients with type 1 diabetes mellitus. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*. 2013;5(3):189.
9. Ismail MM, Abdel Hamid TA, Ibrahim AA, Marzouk H. Serum adipokines and vitamin D levels in patients with type 1 diabetes mellitus. *Archives of medical science : AMS*. 2017;13(4):738-44.
10. Kratzsch J, Deimel A, Galler A, Kapellen T, Klinghammer A, Kiess W. Increased serum soluble leptin receptor levels in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *European journal of endocrinology*. 2004;151(4):475-81.
11. Kurçer Z, Karaoğlu D. Deneysel Diyabet Modellerinde Alloksan ve Streptozotosin Kullanımı. *Turkish Journal of Endocrinology & Metabolism*. 2012;16(2):34-40.
12. Kandhare AD, Raygude KS, Ghosh P, Ghule AE, Bodhankar SL. Neuroprotective effect of naringin by modulation of endogenous biomarkers in streptozotocin induced painful diabetic neuropathy. *Fitoterapia*. 2012;83(4):650-9.
13. Masuzaki H, Ogawa Y, Aizawa-Abe M, Hosoda K, Suga J, Ebihara K, et al. Glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic mice overexpressing leptin with lethal yellow agouti mutation: usefulness of leptin for the treatment of obesity-associated diabetes. *Diabetes*. 1999;48(8):1615-22.
14. Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor SI, Cushman SW. Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology*. 1997;138(10):4463-72.
15. Bradley RL, Cheatham B. Regulation of ob gene expression and leptin secretion by insulin and dexamethasone in rat adipocytes. *Diabetes*. 1999;48(2):272-8.
16. Tsubai T, Noda Y, Ito K, Nakao M, Seino Y, Oiso Y, et al. Insulin elevates leptin secretion and mRNA levels via cyclic AMP in 3T3-L1 adipocytes deprived of glucose. *Heliyon*. 2016;2(11):e00194.
17. Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*. 1996;17(2):305-11.
18. Zlokovic BV, Jovanovic S, Miao W, Samara S, Verma S, Farrell CL. Differential regulation of leptin transport by the choroid plexus and blood-brain barrier and high affinity transport systems for entry into hypothalamus and across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Endocrinology*. 2000;141(4):1434-41.
19. Di Spiezio A, Sandin ES, Dore R, Müller-Fielitz H, Storck SE, Bernau M, et al. The LepR-mediated leptin transport across brain barriers controls food reward. *Molecular metabolism*. 2018;8:13-22.
20. Wang Y, Ali Y, Lim C-Y, Hong W, Pang ZP, Han W. Insulin-stimulated leptin secretion requires calcium and PI3K/Akt activation. *Biochemical Journal*. 2014;458(3):491-8.
21. Kang S-J, Kim J-H, Gang Z, Yook Y-S, Yoon J-R, Ha G-C, et al. Effects of 12-week circuit exercise program on obesity index, appetite regulating hormones, and insulin resistance in middle-aged obese females. *Journal of physical therapy science*. 2018;30(1):169-73.
22. Mueller WM, Gregoire FM, Stanhope KL, Mobbs CV, Mizuno TM, Warden CH, et al. Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology*. 1998;139(2):551-8.
23. Wellhoener P, Fruehwald-Schultes B, Kern W, Dantz D, Kerner W, Born J, et al. Glucose metabolism rather than insulin is a main determinant of leptin secretion in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000;85(3):1267-71.
24. Sonnenberg GE, Krakower GR, Hoffmann RG, Maas DL, Hennes MM, Kissebah AH. Plasma leptin concentrations during extended fasting and graded glucose infusions: relationships with changes in glucose, insulin, and FFA. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(10):4895-900.
25. El Dayem SMA, El Kader MA, Ibrahim S, Mokhtar E, El Megeed EA. Leptin and Lipid Profile in Overweight Patient with Type 1 Diabetes. *Open access Macedonian journal of medical sciences*. 2017;5(2):131.

26. Verrotti A, Basciani F, Morgese G, Chiarelli F. Leptin levels in non-obese and obese children and young adults with type 1 diabetes mellitus. *European journal of endocrinology*. 1998;139(1):49-53.
27. Danne T, Grüters A, Wladimirova A, Weber B, Horn R, Mayr B, et al. Gender-specific differences of serum leptin in obese and normal-weight adolescents: studies in type-1 diabetes and Turner syndrome. *Hormone Research in Paediatrics*. 1997;48(3):103-7.
28. Luna R, Garcia-Mayor RV, Lage M, Andrade MA, Barreiro J, Pombo M, et al. High serum leptin levels in children with type 1 diabetes mellitus: contribution of age, BMI, pubertal development and metabolic status. *Clinical endocrinology*. 1999;51(5):603-10.
29. Raisingani M, Preneet B, Kohn B, Yakar S. Skeletal growth and bone mineral acquisition in type 1 diabetic children; abnormalities of the GH/IGF-1 axis. *Growth Hormone & IGF Research*. 2017;34:13-21.